

Fitopatología

Producción *in vivo* de nemátodos entomopatógenos para el control de la broca del café a partir de la larva del insecto *Galleria mellonella* L., 1758 (Lepidoptera: Pyralidae)¹

Yojana Rodríguez-Benito*, Eliosmar Vázquez-López*, María Esther González-Vega** y Francisco Simón-Ricardo***

Resumen

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de producción de medios biológicos de la Estación Experimental Agro-Forestal de Tercer Frente, durante el período 2011 al 2016, el cual tuvo como objetivo lograr la producción *in vivo* del nemátodo entomopatógeno (*Heterorhabditis* sp.) y su introducción en la base productiva. Para la obtención de los nemátodos entomopatógenos (NEP) se utilizó como organismo susceptible la larva del insecto *Galleria mellonella*, ya que resulta uno de los más apropiados para su desarrollo. La cría de *G. mellonella* se inició con un inóculo constituido por larvas, obtenidas de colmenas en los apiarios, las que se llevaron al laboratorio para iniciar el ciclo productivo, utilizando una dieta elaborada a base de salvado de trigo, soya, maíz y miel de abeja, conservándose a una temperatura entre 25 °C y 30 °C. Con la tecnología y el manejo empleados se logró la estabilidad productiva de los dos organismos, obteniéndose entre 1250 a 1300 larvas de *G. mellonella*/kg de dieta, con solo una mortalidad del 3 %. A partir de las larvas logradas se produjeron 50 000 millones de NEP, que fueron aplicados en áreas de 15 entidades de la base productiva. Los altos niveles de producción de *G. mellonella* alcanzados permitieron generar ingresos entre 10 540,00 a 78 633,00 CUP durante el período evaluado, lo que garantizó la sostenibilidad económica del proceso productivo.

Palabras clave: *Galleria mellonella*, *Heterorhabditis* sp., crías masivas, nemátodos entomopatógenos, *Hypothenemus hampei*.

Abstract

The work was developed in the laboratory of production of biological means of the Estación Experimental Agro-Forestal of Tercer frente, during 2011 at 2016 period; which had as objective to achieve the *in vivo* production of the entomopathogen nematode (*Heterorhabditis* sp.) and their introduction in the productive base. For the obtaining of the entomopathogen nematodes (NEP) it was used as susceptible organism the larva of the *Galleria mellonella* insect, since it is one of the most appropriate for their development. The raising of *G. mellonella* began with an inoculum constituted by larvae, obtained of beehives in the apiary, the same ones were taken to the laboratory to begin the productive cycle, using an elaborated diet with the help of wheat bran, soybean, corn and bee honey; being conserved to a temperature among 25 °C-30 °C. With the technology and the used handling was achieved the productive stability of the two organisms, obtaining among 1250 to 1300 larvae of *G. mellonella*/Kg of diet, with alone a 3 % of mortality. Starting from the achieved larvae 50 000 millions of NEP took places that were applied in areas of 15 entities of the productive base. The high levels of production of *G. mellonella* reached allowed generating revenues among 10.540,00 to 78.633,00 CUP during the evaluated period, what guaranteed the economic sustainability of the productive process.

Key words: *Galleria mellonella*, *Heterorhabditis* sp., massive raising, entomopathogen nematodes, *Hypothenemus hampei*.

¹ Recibido: 13/04/2017

Aprobado: 15/12/2017

* Estación Experimental Agro-Forestal Tercer frente, Santiago de Cuba. sanvegetal2@tercerfrente.inaf.co.cu

** Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). San José de las Lajas, Cuba. esther@inca.edu.cu

*** Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. angelfranciscosimon@gmail.com

Introducción

La adopción del control biológico constituye un proceso complejo y prolongado que requiere de esfuerzos integrados y constantes de personas preparadas para su facilitación, así como de políticas agrarias que lo favorezcan, pues para su incorporación al manejo de las plagas debe competir con la utilización de los plaguicidas sintéticos (Funes y Vázquez, 2016). Sin embargo, el desarrollo y aplicación de agentes biocontroladores adquiere importancia como alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible debido a sus efectos positivos sobre el medio ambiente, ya que la utilización masiva de los productos químicos para el control de plagas es uno de los problemas más graves en materia ecológica; el uso de estos perjudica a la flora, fauna y los recursos hídricos, pero sobre todo a la salud humana (Lanza *et al.*, 2007).

El empleo de los nemátodos entomopatógenos (NEP) es considerado una alternativa promisoriosa en el control de plagas agrícolas, pecuarias y en aquellas que afectan instalaciones industriales (Boemare, 2002, citado por Sáenz, 2005 y Gianfelici y col., 2014). Estos organismos poseen una buena eficiencia, y su uso en Cuba está extendido a zonas agrícolas en todo el territorio nacional (Rodríguez y col., 2012).

Aunque han sido empleados con muy buena efectividad en el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), también se han reportado ampliamente como biocontrol de diversas plagas en todo el mundo, como el barrenador de las raíces de la palma, *Sagalassa valida* (Ortiz *et al.*, 1994); sobre el caracol manzana, *Pomacea canaliculata* (Salcedo, 2013); el cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Andaló *et al.*, 2012); la oruga de las leguminosas, *Anticarsia gemmatalis* (Gianfelici y col., 2014); la polilla guatemalteca, *Tecia solanivora* en la papa (Argotti y *et al.*, 2010); el escarabajo japonés, *Popillia japonica* (Poinar *et al.*, 1987); salivazo de la caña de azúcar, *Aeneolamiavaria* (Rosero, 2011); capachito de los frutales (*Asynonychus cervinus*); cabrito del duraznero (*Aeghorinus superciliosus*); gorgojo de los invernaderos (*Otiorhynchus sulcatus*); polilla de la manzana (*Cydia pomonella*). También se ha reportado su efecto en hormigas, trips, gusanos cortadores, polillas y grillos (Marino y France, 2009), entre otros.

Los nemátodos entomopatógenos se han producido comercialmente y se han vendido en Norteamérica, este de Europa, Asia y Australia. Muchos otros países están explorando la utilización de NEP para el manejo biológi-

co de varios insectos plaga. Sin embargo, sus altos costos en comparación con otros agentes de control hace que se restrinjan a cultivos de alto interés comercial en países en desarrollo (Sáenz, 2005).

Su producción se desarrolla *in vitro* e *in vivo*. Esta última consiste en usar como hospedero larvas de insectos susceptibles. El más usado para la producción comercial es la polilla grande de la cera (*Galleria mellonella* L.), la cual es considerada una plaga de la cera en los apiarios en todo el mundo (Haewoon *et al.*, 1995). La producción de *Heterorhabditis* a gran escala es difícil, ya sea *in vivo* o *in vitro*. La *in vitro* requiere de tecnología y tiene mayores rendimientos de nemátodos por gramo de material sólido (medios de crecimiento) en comparación a la *in vivo* (Susurluk *et al.*, 2013). Sin embargo, los costos asociados con tecnologías, medios sólidos de crecimiento, son mucho mayores que *in vivo* (Kooliyottil *et al.*, 2013).

Las larvas de *G. mellonella* poseen características apropiadas desde el punto de vista morfológico y fisiológico para el desarrollo de los NEP. En larvas de este insecto los entomonemátodos pueden alcanzar dos generaciones y hasta tres, como es el caso de *Steinernema feltiae* (Capinera y Epsky, 1992, citado por Castillo, 1995).

Por lo antes planteado el trabajo tuvo como objetivo lograr la producción *in vivo* de nemátodos entomopatógenos a partir de larvas de *Galleria mellonella*.

Materiales y métodos

En la Estación Experimental Agro-Forestal de Tercer Frente se desarrolló la cría masiva de *Galleria mellonella* y *Heterorhabditis* sp. con el propósito de usar este último en el control de la broca del café y plagas de otros cultivos en las plantaciones y comunidades cafetaleras.

Para ello se utilizan los siguientes materiales:

- Bandejas plásticas de 36 x 20 x 5,5 cm.
- Tarrinas de polipropileno.
- Balanza técnica.
- Balanza analítica.
- Estantes para colocar las bandejas (Imagen 1, B.).
- Deshumificador.
- Termohigrómetro digital para la medición de la temperatura y la humedad relativa.
- Jaula para la cría de adulto, construida con madera y malla antiáfido. Provista de abanicos de nailon para la ovoposición de los adultos (Imagen 2, A y B).

- Dieta elaborada a partir de salvado de trigo, soya, maíz, levadura torula y miel de abeja.
- Equipos de climatización (aires acondicionados y calefactor eléctrico) para mantener una temperatura estable entre 25 °C y 30 °C.

En la figura 1 (A y B) se muestran las tarrinas con huevos de *G. mellonella* (preinfestación) para la eclosión, y estantes con bandejas donde se colocó la preinfestación con las larvas emergidas para continuar con el crecimiento.



Fig. 1. A: Tarrinas con preinfestación. B: Estantes y bandejas para la cría.

En la figura 2 (A y B) se expone la jaula de cría para la reproducción de los adultos y también abanicos

de nailon colgados en el interior de la jaula para la oviposición.

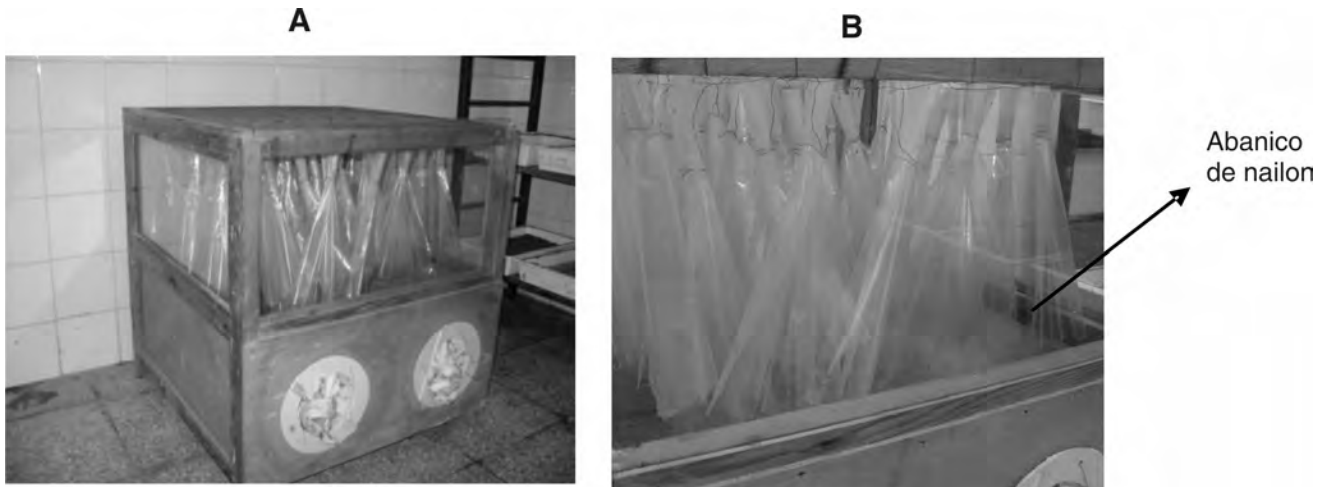


Fig. 2. A: Jaula de cría de adulto. B: Abanicos para la oviposición.

La cría se inició a partir de larvas de *G. mellonella* colectadas en colmenas de apiarios ubicados en áreas de la CCS Jesús Menéndez en el municipio de Tercer Frente. De las larvas colectadas se seleccionaron las más desarrolladas y se observaron bajo un estéreo para com-

probar que se encontraban libre de patógenos y parasitoides. Posteriormente se lavaron en agua destilada y se colocaron en bandejas con 1 kg de una dieta preparada a base de 400 g de salvado de trigo, 204 g de soya, 100 g de maíz, 300 g de miel de abeja (las proporciones de los

componentes de la dieta fueron definidos basado en un estudio realizado previamente). Una vez establecidas en el alimento adecuado, se mantuvieron en estas condiciones hasta que alcanzaron su óptimo desarrollo y comenzaron a empupar. El borde de las bandejas se cubrió con grasa de copilla para evitar el escape de las larvas.

Para el proceso reproductivo se colectaron los cocones con el estado pupal y fueron depositados en la jaula de cría hasta que emergieron los adultos e iniciaron el apareamiento, depositando los huevos en abanicos de nailon colgados de la parte superior de la jaula.

Los huevos fueron colectados y depositados en tarinas de polipropileno que contenían 200 g de la dieta preparada para la cría (Fig. 1-A). Al cabo de los 15 días este preinóculo se llevó a las bandejas con 800 g de la dieta, donde se inició nuevamente el proceso por varias generaciones. Para el inóculo de la preinfestación al inicio de cada ciclo productivo se utilizaron 45 mg de huevos.

Por cada lote de producción se colectaron las larvas en su último instar. Una parte de estas larvas se destinó al ciclo productivo, otra a la producción de nemátodos y otra parte a la comercialización con otras instituciones. Se desarrollaron seis ciclos productivos por año.

Para valorar el comportamiento de la producción de *Galleria mellonella* se evaluaron los indicadores relacionados: larvas vivas, desarrollo de las larvas (longitud, diámetro, peso), mortalidad y rendimiento de NEP (juveniles infectivos obtenidos/larva de *G. mellonella*). El estudio se hizo en un período de seis años (2011-2016).

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico Statgraphics 5.1. Se transformaron los datos utilizando la ecuación logarítmica $X' = \log X + 1$, según Lerch (1977). Se realizó un análisis de varianza, para contrastar el comportamiento de la producción de *G. mellonella* por año y la comparación de las medias se realizó utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan. La normalidad de los datos se comprobó a través de la prueba de Shapiro y Wilk (1965) y la homogeneidad de la varianza utilizando la prueba de Levene (Brown y Forsythe, 1974).

Se hizo un análisis de regresión para determinar la relación entre la mortalidad y la cantidad de larvas obtenidas. Los datos se ajustaron a diferentes ecuaciones y se seleccionó la curva de mejor ajuste.

Resultados y discusión

La producción de larvas de *Galleria mellonella* mantuvo un comportamiento estable durante el período evaluado. Entre 2011 y 2013 no se observaron diferencias significativas (Tabla 1), y aunque en 2014 se obtuvo un pico de producción (con un incremento de un 36,7 % con relación al año anterior), no se diferenció de la obtenida en 2012 y 2013.

Posteriormente en 2015 la producción volvió a decrecer, diferenciándose estadísticamente de las obtenidas de 2012 a 2014 (Tabla 1). Esta declinación en la producción no se debió a problemas biológicos, ni de manejo en el laboratorio, sino más bien al déficit de algunos de los recursos que se requieren para la preparación de la dieta.

La mortalidad tuvo un comportamiento similar y estuvo relacionada con los niveles de producción; como promedio fue de un 3 % para los seis años evaluados (Tabla 1). Esta mortalidad puede considerarse baja, teniendo en cuenta que por cada kilogramo de dieta se obtuvieron entre 1250 y 1300 larvas de *G. mellonella*. No obstante, es necesario continuar con los estudios que aborden el rendimiento de las larvas por unidad de dieta, ya que este es un aspecto que influye en el desarrollo de este organismo (Salas, 2015). Realpe *et al.* (2007) proponen como adecuada una producción de 230 larvas por cada 300 g de dieta, con una mortalidad del 23,1 %.

Tabla 1. Comportamiento por año de la producción de larvas de *Galleria mellonella* en el laboratorio de la Estación Experimental Agro-Forestal de Tercer Frente

Período	Larvas obtenidas (U)	Larvas muertas (U)
Año 2011	171 893 bc	2927 b
Año 2012	362 422 ab	4433 ab
Año 2013	462 321 ab	8697 ab
Año 2014	631 910 a	16 320 a
Año 2015	222 174 c	9228 b
Año 2016	256 998 bc	11 747 ab
Es	0,19	0,13
CV	41,38 %	45,84 %

Durante el período estimado se produjeron más de dos millones de larvas de *G. mellonella* con un 97 % de larvas vivas, de las cuales el 67 % se comercializaron, el 22 % se emplearon en el ciclo productivo y un 12 % de las larvas logradas se destinaron a la producción de NEP (Fig. 3).

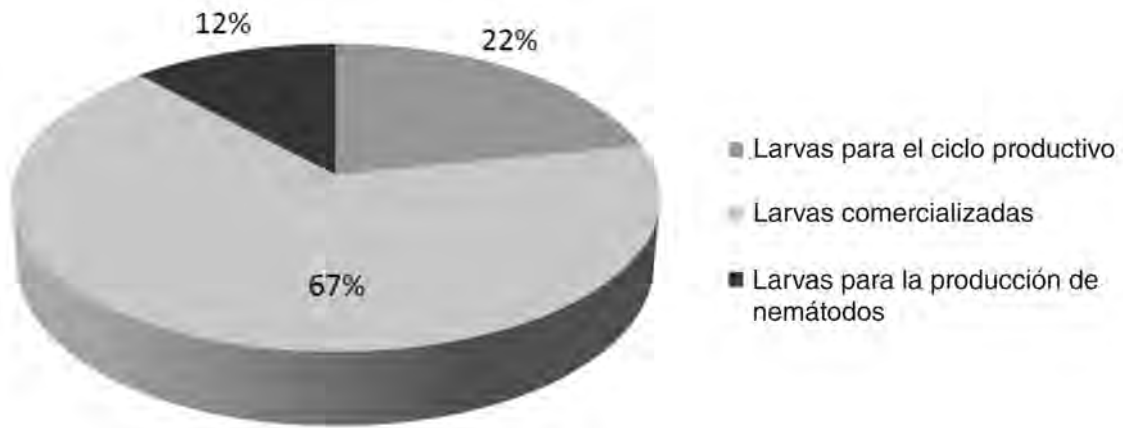


Fig. 3. Producción de larvas de *G. mellonella* destinadas a la producción de nemátodos, comercialización y al ciclo productivo.

Las larvas logradas tuvieron un desarrollo adecuado (Fig. 4, Tabla 2) y el rendimiento de los nemátodos fue entre 187 000 y 202 000 Ji (juveniles infectivos)/larva de *G. mellonella*.



Fig. 4. Larvas de *G. mellonella* obtenidas.

Tabla 2. Desarrollo promedio de las larvas de *G. mellonella* logradas y juveniles infectivos de NEP obtenido por larva

Período	Peso (mg)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Ji/larvas
Año 2012	231,83	2,03	0,46	190 000
Año 2013	233,90	2,12	0,51	200 000
Año 2014	228,70	2,14	0,51	202 000
Año 2015	199,83	1,97	0,47	187 000

Cabe señalar que el desarrollo que alcanza la larva de *G. mellonella* permite obtener hasta más de 200 000 Ji/larva. Sáenz y Luque (2000) lograron en larvas grandes de este insecto entre 138 405 y 179 378 Ji/larva; ellos consideraron como larvas grandes las que poseían una longitud entre 2-3 cm y un peso entre 0,25 g-0,35 g. Rodríguez y col. (2014) reportaron rendimientos 165 000 Ji en larvas con más de 18 mm de longitud.

Realpe *et al.* (2007) alcanzaron rendimientos de 86 250 y 78 750 Ji/larvas de *G. mellonella* para las especies de NEP *Steinernema colombiense* y *Heterorhabditis bacteriophora*, respectivamente, mientras que Milstead y Poinar (1978) informaron un rendimiento de 350 000 Ji de *H. bacteriophora*.

Salas (2015), en crías desarrolladas con dietas artificiales, lograron larvas de segunda generación de hasta 23,4 mm; 5,1 mm de diámetro y 0,293 g de peso, como promedio.

Para lograr el desarrollo de la larva de *G. mellonella*, mostrado en la tabla 2, así como rendimientos superiores a 1000 larvas/kg de dieta, con una baja mortalidad como se señaló anteriormente, fue necesario precisar algunos elementos del proceso productivo, así como en el manejo:

- Dieta: proporción de los componentes (20-30 % de soya; 10 % de maíz; 30-35 % de miel de abeja y el resto de salvado de trigo como material inerte).
- Preinfestación con la proporción requerida para los niveles propuestos. En este caso se estableció 45 mg de huevo.
- Fraccionamiento de la miel, según las exigencias de la camada por bandeja.
- Recolección de las larvas más desarrolladas en dos etapas por mes para evitar la competencia.
- Consignar al ciclo productivo entre un 22 %-30 % de las larvas obtenidas.

- Condiciones de temperatura en el laboratorio entre 25 °C y 30 °C, evitando las fluctuaciones que pueden afectar el normal desarrollo del insecto.

Otro aspecto significativo dentro del manejo fue la reactivación del pie de cría, con la introducción anual de larvas procedentes de los apiarios (su hábitat natural); de esta forma se evitan los problemas de consanguinidad, ya que cuando se obtienen crías sucesivas en sustratos artificiales se observa una disminución de la oviposición.

Según Arrarás *et al.* (1986), es posible mantener sin inconvenientes en estas condiciones, hasta aproximadamente siete generaciones de *Gallería mellonella*, a partir de la cual comienza un decrecimiento de la fecundidad, manifestada a través de una menor oviposición, disminución en el porcentaje de huevos eclosionados y retardo en el apareamiento y oviposición de las mariposas.

La producción de nemátodos solo se comenzó a desarrollar a partir de 2013, y al igual que la producción de *G. mellonella*, tuvo un incremento en 2014, disminuyendo posteriormente. Sin embargo, la obtención de NEP estuvo en función de la demanda por el sector productivo de café en el municipio, por lo que a partir de 2015 se tuvo que reducir la producción por la intensa sequía, que impidió continuar con las aplicaciones en el etapa que correspondía (Fig. 5). En el manejo de *Hypothenemus hampei*, los NEP se recomiendan para el control de las poblaciones que permanecen en los frutos del suelo, excedentes de la cosecha.

Los nemátodos entomopatógenos fueron aplicados en áreas cafetaleras de 15 entidades de la base productiva (Tabla 3), lo que propició una disminución del índice de infestación por broca del café hasta de un 75 % aproximadamente en las áreas tratadas. Paralelamente a las entregas del bioproducto se brindó asesoría técnica y capacitación a los productores para una mejor aplicación del mismo.

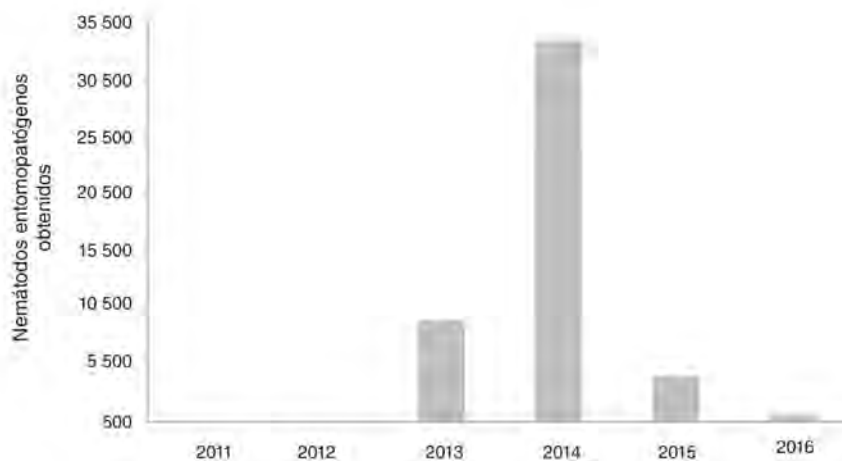


Fig. 5. Nemátodos entomopatógenos obtenidos en el período evaluado (millones).

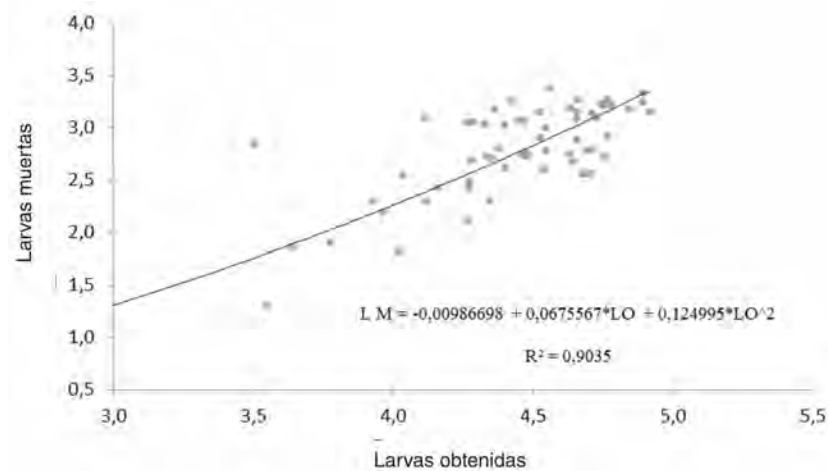
Tabla 3. Aplicaciones de nemátodos entomopatógenos (NEP) en entidades de la base productiva en el municipio de Tercer Frente para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferr)

No.	Entidad	Nombre	Año 2013 (millones)	Año 2014 (millones)	Año 2015 (millones)
1	CCS	Ignacio Pérez	-	2000	-
2	CCS	Jesús Menéndez	-	5200	-
3	CCS	José Fernández	-	2900	-
4	CCS	Sabino Pupo	-	800	-
5	CPA	Benjamín Pardo	1570	-	-
6	CPA	Carlos Manuel de Céspedes	-	3925	-
7	CPA	José Tey	-	1850	-
8	CPA	Otto Parellada	-	5225	4472
9	CPA	VI Cumbre	-	1455	-
10	GIM	24 de Febrero	-	625	-
11	UBPC	Arroyo Rico	4117	1500	-
12	UBPC	14 de Junio	-	875	-
13	UBPC	La Silla	-	500	-
14	UBPC	Los Baños	-	750	-
15	UBPC	Mario Muñoz	-	1300	-

En la figura 6 se muestra el resultado del análisis de regresión.

Dado que el p-valor es inferior a 0,01, se evidencia que existe relación estadísticamente significativa entre

la cantidad de larvas obtenidas y la mortalidad, para un nivel de confianza del 99 %. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 0,341915.



* LM: Larvas muertas. LO: Larvas obtenidas

Fig. 6. Relación entre las larvas obtenidas y la mortalidad del insecto.

Es necesario subrayar que la tecnología de producción empleada y el manejo desarrollado en el laboratorio permitieron garantizar una producción estable de larvas del insecto de *G. mellonella*, lo cual constituye el recurso más importante para la obtención de los NEP. Este insecto brinda muy buenos resultados como biorreactor para la producción *in vivo* de estos organismos.

Según Gómez y col. (2001), la larva de *G. mellonella* ha sido utilizada universalmente como hospedero para la reproducción *in vivo* de los géneros de NEP *Steinernema* y *Heterorhabditis*.

Cabe señalar que las larvas de *G. mellonella*, por su contenido proteico y de ácidos grasos, les confieren a los NEP obtenidos a partir de ellas atributos que elevan su efectividad como controladores biológicos de plagas, como son una mayor virulencia, persistencia en el suelo y una elevada reproductividad.

Según Avignon (2009), citado por Salas (2015), estas larvas poseen alrededor de un 27 % de proteínas y un 73 % de materia grasa. Debido a estas propiedades el insecto también es usado como dieta en la cría de animales debilitados como peces, anfibios, reptiles, aves, pequeños mamíferos, entre otros. Fusté *et al.* (2013) las proponen como un componente en la dieta para la cría de vencejo azul. La Empresa Farmacéutica (Labiofam) en nuestro país lo emplea en la cría de escorpiones.

Por ende, una parte importante de la producción de larvas fue comercializada, generando un ingreso total de 119 875,80 CUP y 19 979,30 CUP como promedio anual,

lo que permitió garantizar la sostenibilidad económica del laboratorio, contribuyendo también a la estabilidad productiva.

Estas son alternativas que pueden ser aprovechadas para generar ingresos y contribuir al mantenimiento económico de la producción. De esta forma, en los períodos donde no se aplica el NEP, o bien porque no se requiere la aplicación o por factores adversos del clima, se puede mantener el flujo productivo sin incurrir en pérdidas económicas, garantizando la disponibilidad del bioproducto, en función del manejo de la broca del café y otras plagas agrícolas.

Conclusiones

- Con la tecnología de producción empleada y el manejo desarrollado en el laboratorio se produjeron más de dos millones de larvas de *G. mellonella* con un 97 % de larvas vivas y un 3 % de mortalidad.
- Las larvas obtenidas mostraron un desarrollo adecuado, con rendimientos entre 1250 a 1300 larvas/kg de dieta.
- Los nemátodos entomopatógenos obtenidos a partir de esta producción de larvas fueron introducidos en áreas de 15 entidades de la base productiva para el control de la broca del café.

Bibliografía

Andaló, Vanessa; Viviane Santos; Grazielle F. Moreira; Camila Moreira; Marcela Freire y A. Moino: Move-

- ment of *Heterorhabditis amazonensis* and *Steinernema arenarium* in search of 5corn fall armyworm larvae in artificial conditions. *Sci. Agric.*, 69 (3): 226-230, 2012.
- Argotti, E. E.; Gallegos, P.; Alcazar, J. y H. Kaya: Patogenicidad de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre larvas de *Tecia solanivora* en Ecuador. *Bol. Téc. 9, Ser. Zool.*, 6: 162-172, 2010.
- Arrarás, E. A.; Arcas, J. A. y O. M. Yantorn: Cría artificial de *Galleria melonella* y su empleo en la medida de la actividad bioinsecticida de suspensiones de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *Rev. Facultad de Agronomía*, 7 (1): 71-76, 1986.
- Brown, M. B. and A. B. Forsythe: Robust Test for the Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association*, 69(346): 364-367, 1974.
- Castillo, A.: "Evaluación de nemátodos entomopatógenos (Rabbitida: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) para el control biológico de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferr. en Chiapas, México" [Inédito], tesis de candidatura. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Subdirección General Adjunta de Enseñanza. Programa de Posgrado. Turrialba, Costa Rica. 1995.
- Funes, F. y L. L. Vázquez: *Avances de la Agroecología en Cuba*. Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. La Habana, 604 pp., 2016.
- Fusté, E.; Obon, E. and L. Olid: Head-reared common swifts (*Apusapus*) in a wildlife rehabilitation centre: assessment of growth rates using different diets. *Journal of zoo and aquarium research. European Association of Zoos and Aquaria (EASA)*, 19 pp., 2013.
- Gianfelici, María de L.; María A. Bertolotti y Susana R. Cagnolo: Susceptibilidad de larvas de *Crocidosema apoderma* (Walsingham, 1914) y *Anticarsigem matialis* Hübner, 1818, a tres aliados de nematodos entomopatógenos. *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 1(2): 71-76, 2014.
- Gómez, L., Soler, D. M. y L. Sánchez: Virulencia y Potencial Reproductivo de Aislamientos Cubanos de Nematodos Entomopatógenos. *Rev. Protección Veg.*, 16(1): 50-54, 2001.
- Haewoon, O; Young, M. y Y. Chang: Developing periods of damage patterns of combs by the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Api. Res.*, 10(1):5-10, 1995.
- Kooliyottil, R.; Upadhyay, D.; Inman, F.; Mandjiny, S. y L. Holmes: A comparative analysis of entomoparasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *Open Journal of Animal Sciences*, 3 (4): 326-333, 2013.
- Lanza, C. J.; Ardon, R. L.; Rivera, C. E. y O. A. Ramos: "Control biológico de la broca del fruto del cafeto" [Inédito], tesis de candidatura. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN – CUR – Matagalpa. 2007.
- Lerch, G.: *Experimentación en las ciencias biológicas y Agrícolas*. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 452 pp., 1977.
- Marino, L. y A. France: Nematodos entomopatógenos: Eficiente apuesta en el control biológico de plagas. Centro Tecnológico de Control Biológico. *Informativo 2*. Chile, 2 pp., 2009.
- Milstead, J. E. and G. O. Poinar: A new entomogenous nematode for pest management systems. *Calif. Agric.*, 32(3): 12-14, 1978.
- Ortiz, L. E.; Calvache, H. y E. Luque: Control microbiano de *Sagalassa valida* Walker (Lepidoptera: Glyphipterigidae) con el nematodo *Steinernema carpocapsae* (weiser) en Tumaco (Nar.). *Palmas*, 15 (1): 29-37, 1994.
- Poinar, G. O.; Jackson, T. and M. Klein: *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida), Parasitic in the Japanese Beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. *Proc. Helminthol. Soc. Wash*, 54 (1): 53-59, 1987.
- Realpe A., F. J.; Bustillo P., A. E. y J. C. López N.: Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nemátodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé*, 58(2):142-157, 2007.
- Rodríguez, Danay; Jacqueline Pereira y Nury Pérez: Producción y calidad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) Cepa CH1 en el CREE Ciro Redondo, Ciego de Ávila, Cuba. *Revista Granma Ciencia*, 18 (2):1-9, 2014.
- Rodríguez, Mayra; Dainé Hernández y Lucila Gómez: Nematodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la agricultura en Cuba. *Rev. Protección Veg.*, 27 (3): 137-146, 2012.
- Rosero, Miriam: "Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar, *Aeneolamia varia* (F) (Hemiptera: Cercopidae)" [Inédito], tesis de candidatura. Universi-

- dad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, 2011.
- Sáenz, A.: Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas*, 26(2): 41-57, 2005.
- Sáenz, A. y J. E. Luque: Cultivo *in vivo* y método de almacenamiento para juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* (Rhabdita: Steinernematidae). *Agronomía Colombiana*, 17: 37-45, 2000.
- Salas, M. A.: "Efecto de dietas artificiales en la crianza de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)" [Inédito], tesis de candidatura. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Trujillo, Perú, 2015.
- Salcedo, G. A.: Acción patogénica de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) sobre el caracol manzana (*Pomacea canaliculata* Lamarck), plaga de los cultivos de arroz (*Oriza sativa*) en la cuenca baja del río Daule, Guayas, Ecuador. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 17(2): 53-56, 2013.
- Shapiro, S. S. and M. B. Wilk: An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52:591-611, 1965.
- Susurluk, A.; Kongu, Y. and T. C. Ulu: Quality control of *in vitro* produced *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strains isolated from Turkey. *Türk. entomol. derg.*, 37 (3): 283-291, 2013.

